

# C57BL/6 小鼠听皮层 A1 区 LTP 特性\*

臧绍云 毛玉婷 孙心德\*\*

(华东师范大学生命科学院脑科学研究中心 上海 200062)

**摘要:** 应用在体细胞外记录群体细胞兴奋性突触后场电位方法, 研究 C57BL/6 小鼠听皮层 A1 区突触长时程增强(LTP)特性。观察到, 给予模拟的  $\theta$  节律电刺激(TBS), 刺激听皮层白质, 可在听皮层灰质 II/III 层记录到明显 LTP。根据 TBS 后 LTP 幅度变化特征, LTP 可分为瞬时增强型(有 PTP)和缓慢增强型。高强度 TBS 诱导的 LTP 增幅百分数比低强度 TBS 诱导的 LTP 增幅大, 但两者诱导的 LTP 成功率无显著差异。实验还表明, 2 月龄小鼠较 4 月龄小鼠 LTP 幅度增长率更高, 提示听皮层 LTP 具有年龄依赖性特征。实验结果为进一步研究听觉模态学习记忆的神经机制提供了资料。

**关键词:** C57BL/6 小鼠; 初级听皮层; TBS; LTP; PTP

**中图分类号:** Q429.8, Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2004)06-33-05

## Characteristics of Long-term Potentiation in Auditory Cortex A1 Area of C57BL/6 Mice

ZANG Shao-Yun MAO Yu-Ting SUN Xin-De

(*Research Center for Brain Science, College of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China*)

**Abstract:** This study investigated the characteristics of long-term potentiation (LTP) in auditory cortex A1 area of C57BL/6 mice by using the technique of extracellular record of field potentiation (FP) *in vivo*. Evident LTP is induced in auditory cortex A1 area by electrical theta-burst stimulation (TBS) of white matter as revealed by extracellular record of FP in II/III layer. According to the characteristic changes in field potential amplitude, one type LTP showed the PTP, while the other not. High intensity TBS induced larger increase in amplitude of evoked field potential than low intensity TBS did. But the success rate between them showed no significant difference. This may illustrate that the depotentiation degree determines the increased amplitude of LTP. Auditory LTP was age-dependent, since we found that induced LTP in 2-month-old mice was much more evident than in 4-month-old mice. This study provides useful data for future research of neural mechanism of auditory memory.

**Key words:** C57BL/6 mice; Primary auditory cortex; TBS; LTP; PTP

\* 国家自然科学基金(No. 30170313), 博士点基金(No. 20020269005), 上海市重点学科项目;

\*\* 通讯作者, E-mail: xdsun@bio.ecnu.edu.cn, sunxinde@hotmail.com;

第一作者介绍 臧绍云, 25 岁, 女, 硕士研究生; 研究方向: 神经生物学。

收稿日期: 2004-02-23, 修回日期: 2004-09-25

自 1973 年 Bliss 首次发现突触传递的长期增强效应 (long-term potentiation, LTP) 以来, LTP 一直被认为是学习与记忆的神经机制之一。随着海马脑区 LTP 的深入研究, 很多学者又把目光转移到听皮层。已发现皮层不同部位 LTP 存在差异。Rudoh 等发现, 听皮层所记录到的 LTP 要比视皮层大。由于听皮层 II/III 层的水平方向的突触密度较视皮层要大两倍, 而这些突触多为兴奋性的, 提示形态学特性与 LTP 特性的一致性<sup>[1]</sup>。本文在 C57BL/6 小鼠上, 在体记录听皮层 A1 区 LTP, 并观察了不同刺激强度所诱导的 LTP 特性, 为进一步研究听觉模式学习与记忆的神经机制提供实验依据。

## 1 研究方法

**1.1 实验动物** 清洁级成年 C57BL/6 小鼠(购自中科院动物中心), 雌雄不拘, 共 20 只, 体重 20 ~ 25 g。

**1.2 手术** 取健康 C57BL/6 小鼠, 麻醉(20% 乌拉旦, 5 mg/kg 腹腔注射)后, 剪去头部被毛, 盐酸普鲁卡因(20 mg/ml)皮下注射局部麻醉, 沿矢状缝切开皮肤, 分离皮下组织, 暴露头骨, 并用 10% 双氧水洗净骨面, 用 502 胶水和牙科水泥将一根长 2 cm 左右的铁钉粘固在颅骨上, 以备头部的固定, 皮肤复位缝合。在颞部上方切开皮肤, “T”形切口约 7 mm × 4 mm, 清除结缔组织, 暴露颞骨, 保持颅骨湿润。动物移于实验台架上, 通过头部的铁钉将动物头部固定, 保持水平。在手术解剖镜下, 根据初级听皮层血管的特征并参照小鼠脑图谱<sup>[15]</sup>, 确定初级听皮层的位置。

**1.3 电刺激** 电刺激信号由电子刺激器(MASTER-8)给出, 经刺激隔离器(ISO-FLEX)到达刺激电极。刺激电极是双股绞合的绝缘镍铬丝, 尖端间距约 0.2 mm, 电阻 0.5 ~ 0.8 MΩ。在微操纵仪(MC1000e)的控制下, 把刺激电极定位在初级听皮层(前囟 - 2.30 ~ - 3.80 mm 嗅沟上), 并垂直插入皮层白质(深度: 0.80 ~ 1.00 mm)。实验的测试刺激参数是: 1/15 Hz, 波宽 50 μs, 强度为使引出的场电位达最大幅度的最小

强度(40 ~ 500 μA)。强度一经确定就保持不变。θ 节律刺激(theta burst stimulation, TBS)参数为: 5 个 100 Hz 的脉冲为一串, 共 11 串, 串频率为 5 Hz, 每间隔 5.2 s 重复一次, 共重复 10 次。TBS 的低强度与测试刺激强度保持一致, 高强度则在测试刺激强度基础上再增加 10 μA。TBS 之后, 转换到测试刺激, 记录场电位的变化。

**1.4 记录** 玻璃微电极尖端直径 0.5 ~ 1.0 μm, 阻抗 10 ~ 20 MΩ, 内充 3 mol/L KCl 溶液, 借助微操纵仪(MX7600), 在手术显微镜下将记录电极尖端垂直插入初级听皮层 II/III 层(深度: 0.1 ~ 0.3 mm), 并使刺激电极和记录电极尖端在皮层同一垂直柱内, 记录信号经前置放大器(ISODAMX)和后置放大器进入电脑和示波器(VC-6545), 由 AVERAGE 软件采集和储存信号, 并进行数据测量。

**1.5 数据处理** 原始的场电位幅度数值, 每 4 min 平均一次, 以条件刺激前 20 min 内的场电位幅度平均值为 100%, 条件刺激前后各时间点的场电位幅度平均值与之比较, 以百分数表示。实验数据呈正态分布, 以  $\bar{X} \pm SE$  表示, 采用双尾 *t*-检验进行显著性测验。图 1A 为一个神经元上记录的场电位及 TBS 诱导的 LTP。

## 2 结果

**2.1 两种模式的 LTP** 在 20 只小鼠听皮层 A1 区共观察了 44 个神经元的 LTP, 根据 TBS 后 LTP 幅度变化特征, 将其分为两类(图 1)。

A 类: 给予 TBS 后, 神经元场电位幅度呈缓慢上升, 20 min 左右达到高峰, 之后基本维持在该水平达 2 h 以上。TBS 后 120 min, 平均幅度增长百分数为  $211.15 \pm 11.49$ ; 最大幅度增长可达 370.61, 最小幅度增长为 148.97。在 44 个神经元中, 有 15 个属这种类型(图 1:B)。

B 类: 给予 TBS 后, 神经元出现强直后增强(post-tetanic potentiation, PTP)现象, 场电位瞬时上升至最高峰, 10 min 左右缓慢降至一稳定水平达 2 h 以上, 这类神经元共观察到 14 个。这些神经元在 TBS 后 120 min, 场电位的幅度平均

增长  $232.11 \pm 12.21$ ; 最大幅度增长可达  $367.09$ , 最小幅度增长可达  $125.79$ (图 1:C)。

还有 15 个神经元的 LTP 特征介于以上两种类型之间。

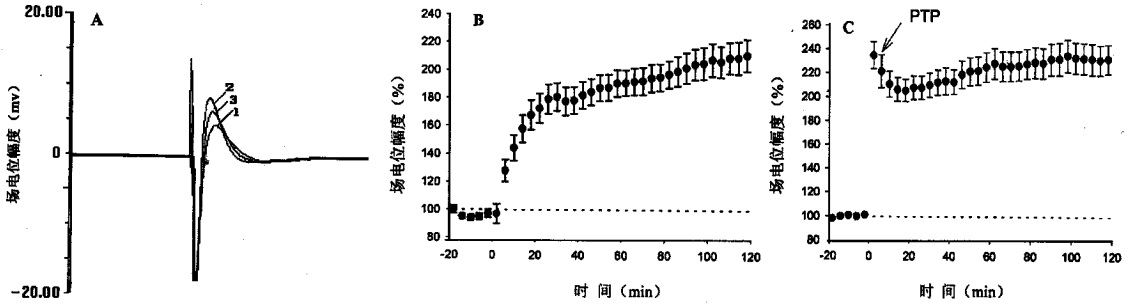


图 1 TBS 诱导的 LTP

A. LTP 诱导中场电位变化图: 1. 强直刺激前; 2. 强直刺激后 1 min; 3. 强直刺激后 1 h; B. A 类 LTP, 没有出现强直后增强 ( $n = 15$ ); C. B 类 LTP, 有明显的强直后增强(箭头所示。  $n = 14$ )

2.2 不同强度的 TBS 诱导的 LTP(图 2) 实验观察到, 低强度 TBS 诱导的 LTP ( $n = 9$ ) 幅度增长百分数相对较低, TBS 后 120 min, 平均幅度增长为  $131.16 \pm 7.37$ ; 最大幅度增长为  $172.86$ , 最小幅度增长为  $111.10$ , 但多数在  $120.00 \sim$

$140.00$  之间。高强度的 TBS 诱导的 LTP ( $n = 8$ ) 幅度增长百分数相对较高, TBS 后 120 min, 平均幅度增长为  $177.74 \pm 5.56$ ; 最大幅度增长可达  $262.07$ , 最小幅度增长为  $121.09$ , 多数在  $180.00 \sim 200.00$  之间。经  $t$ -检验, 低强度和高

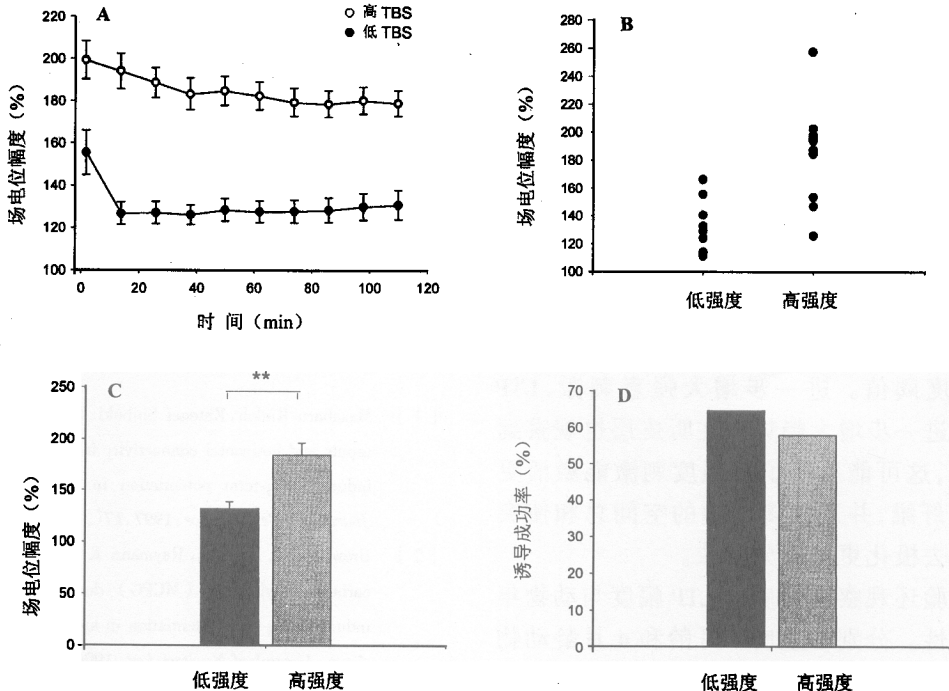


图 2 不同强度 TBS 诱导的 LTP 增长幅度比较

A. 低强度和高强度 TBS 诱导的场电位幅度变化; B. 低强度和高强度 TBS 诱导的场电位幅度增长百分数分布; C. TBS 后 120 min 低强度和高强度 TBS 诱导的场电位幅度增长百分数对比 (\*\*  $P < 0.01$ ); D. 低强度和高强度 TBS 诱导出 LTP 的成功率对比

强度 TBS 诱导 LTP 的幅度增长百分数差异显著 ( $P < 0.01$ )。但低强度和高强度 TBS 诱导 LTP 的成功率相差不显著。

### 3 讨论

以往 LTP 的研究多集中在海马脑区。近年来,对新皮层 LTP 的研究也开始增多,并发现 LTP 在皮层的不同部位表达程度不同,但这些工作多在离体脑片上进行,听皮层在体记录 LTP 少有详细报道。本实验观察到,听皮层在体记录 LTP 与离体记录 LTP 相似,也比较容易诱导,其诱导成功率可达 60% 以上, LTP 持续时间也可长达 4 h 以上。在本实验条件下,使用 TBS 诱导的 LTP 也有两类,一类表现为 TBS 后场电位幅度瞬时增强,之后下降到一平稳水平。另一类则在 TBS 后,场电位幅度缓慢上升并达一平稳水平。两者的区别明显表现在是否出现 PTP。一般认为,PTP 是突触前的反应,大约持续 10 min 左右,可能是由于递质释放量的增加所致。

本实验中,应用了 TBS 作为条件刺激。已有不少报道称,TBS 较高频刺激(HFS)诱导 LTP 更加有效<sup>[2-4]</sup>。本实验室在小鼠离体脑片上也已得到证实。实验中观察了不同强度 TBS 诱导 LTP 的差异,高强度的 TBS 所诱导的 LTP 幅度增长百分数要明显大于低强度 TBS 诱导的 LTP 幅度增长百分数。在海马脑区的研究表明,LTP 的诱导成功,其强直刺激必须达到引起 LTP 的强度阈值。进一步增大强直刺激,LTP 的幅值有进一步增大趋势。在听皮层也观察到类似现象,这可能反映了高强度刺激能激活更多的传入纤维,并通过多突触的空间总和使突触后膜的去极化更加充分所致。

本实验还观察了听皮层 LTP 幅度与动物年龄的相关性。分别在生后 2 月龄和 4 月龄动物上进行了观察。发现前者听皮层 LTP 幅度明显大于后者(图 3)。其中,2 月龄小鼠在 TBS 后 35 min,听皮层 LTP 幅度增长百分数平均为  $174.61 \pm 13.08$ ,而 4 月龄小鼠的 LTP 在 TBS 后 35 min,平均幅度增长百分数为  $120.38 \pm 3.68$ 。提示小

鼠听皮层 LTP 也有年龄依赖性特征。Crair 等在大鼠丘脑皮层突触传递研究中曾观察到,在生后 3~7 d 的大鼠上几乎都可诱导出 LTP,但随着日龄增加,LTP 幅度越来越小,生后 8 d 的动物几乎不再能诱导出 LTP<sup>[5]</sup>。LTP 的诱导与 NMDA 受体有着密切的关系,这在海马、视皮层都已得到证明<sup>[6-9]</sup>。已有研究表明,听皮层 LTP 也依赖于 NMDA 受体的激活,可能由 NMDA 受体介导<sup>[10-12]</sup>。本实验室关于大鼠听皮层 NMDARs mRNA 表达研究显示<sup>[13,14]</sup>, NMDARs 表达是年龄依赖性的,特别是 NR2B 亚单位在大鼠刚出生时即有高水平表达,随着年龄增加呈明显下调趋势,这与听皮层 LTP 诱导趋势有些吻合,但是否有相关性正在研究之中。

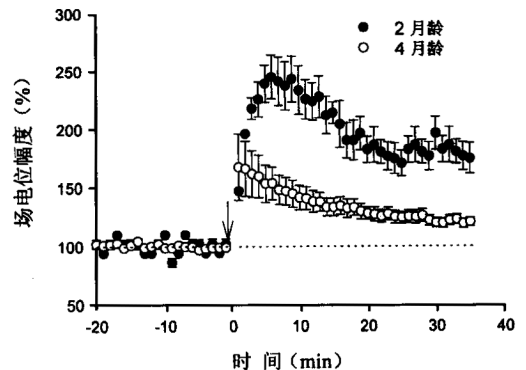


图 3 TBS 诱导的 2 月龄 ( $n=3$ ) 和 4 月龄 ( $n=5$ ) 小鼠听皮层 LTP 幅度的比较

### 参 考 文 献

- [1] Masaharu Kudoh, Kateuei Shibuki. Importance of polysynaptic inputs and horizontal connectivity in the generation of tetanus-induced long-term potentiation in the rat Auditory cortex. *Journal of Neuroscience*, 1997, 17(24): 9 458 ~ 9 465.
- [2] Brown R E, Rabe H, Reymann K G. (RS)-alpha-methyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG) does not block theta burst-induced long-term potentiation in area CA1 of rat hippocampal slices. *Journal of Neurosci Lett*, 1994, 170(1): 17 ~ 21.
- [3] Vickery R M, Morris S H, Bindman L J. Metabotropic glutamate receptors are involved in long-term potentiation in isolated slices of rat medial frontal cortex. *J Neurophysiol*, 1997, 78(6): 3 039 ~ 3 046.
- [4] Yun S H, Mook-Jung I, Jung M W. Variation in effective

- stimulus patterns for induction of long-term potentiation across different layers of rat entorhinal cortex. *J Neurosci*, 2002, **22** (5):RC214.
- [5] Michael C C, Robert C M. A critical period for long-term potentiation at thalamocortical synapses. *Nature*, 1995, **375**: 325 ~ 328.
- [6] Benjamin D P, Michael P W, Margarita S R, et al. Effect of transgenic overexpression of NR2B on NMDA receptor function and synaptic plasticity in visual cortex. *Neuropharmacology*, 2001, **41**:762 ~ 770.
- [7] Bliss T V P, Collingridge G L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 1993, **361**: 31 ~ 38.
- [8] Collingridge G L, Bliss T V P. Memories of NMDA receptors and LTP. *Trends in Neuroscience*, 1995, **18**:54 ~ 56.
- [9] Dean V B. Distinct functional types of associative long-term potentiation in neocortical and hippocampal pyramidal neurons. *Journal of Neuroscience*, 1999, **19**(16):6 748 ~ 6 754.
- [10] Masaharu Kudoh, Kateuei Shibuki. Long-term potentiation in the auditory cortex of adult rats. *Neuroscience Letters*, 1994, **171**:21 ~ 23.
- [11] Toshiyuki Fujisaki, Masaharu Kudoh, Katsuei Shibuki. Functional brain block preparation of the rat auditory cortex. *Neuroscience Research*, 1995, **23**:321 ~ 326.
- [12] Masaharu Kudoh, Kateuei Shibuki. Long-term potentiation of supragranular pyramidal outputs in the auditory cortex. *Exp Brain Res*, 1996, **110**:21 ~ 27.
- [13] 卢静萍,崔一蕾,毕彩霞等.大鼠出生后发育中听皮层 NR1 mRNA 的表达.中国神经科学杂志,2003, **19**(3): 177 ~ 181.
- [14] 崔一蕾,卢静萍,吴芳等.大鼠听皮质 NMDA 受体亚单位 NR2B mRNA 年龄-依赖性表达.中国神经科学杂志, 2002, **18**(1):405 ~ 408.
- [15] Paxinos G, Franklin K B J. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2001.